

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

特許第3042774号

(P3042774)

(45) 発行日 平成12年 5 月22日 (2000. 5. 22)

(24) 登録日 平成12年 3 月10日 (2000. 3. 10)

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

G 0 1 N 27/447

G 0 1 N 27/26

3 1 5 H

請求項の数 9 外国語出願 (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平10-123273

(22) 出願日 平成10年 5 月 6 日 (1998. 5. 6)

(65) 公開番号 特開平11-30605

(43) 公開日 平成11年 2 月 2 日 (1999. 2. 2)

審査請求日 平成10年 5 月 6 日 (1998. 5. 6)

(31) 優先権主張番号 0 8 / 8 5 1 8 2 9

(32) 優先日 平成 9 年 5 月 5 日 (1997. 5. 5)

(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(73) 特許権者 591099809

バイオラッド ラボラトリーズ, イン
コーポレイティド

アメリカ合衆国, カリフォルニア
94547, ハーキュルズ, アルフレッド
ノーベル ドライブ 1000

(72) 発明者 ドゥニ フランソワ ホフシュトラセー
ル

スイス国, ジュネーバ, 1245 コロンジ
ューベルリブ, シュマン ドゥ ラ サ
ボニエール, 27

(74) 代理人 100077517

弁理士 石田 敬 (外 4 名)

審査官 郡山 順

(56) 参考文献 特開 平 2 - 151758 (J P, A)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 二次元電気泳動装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 プレキャスト二次元電気泳動ゲルシステムであって、長いストリップ状の第一電気泳動分離媒体及びスラブ状の第二電気泳動分離媒体を含んで成り、前記長いストリップ及び前記スラブは単独の支持手段上に保持されており、且つ取外し可能な流体不浸透性の電気絶縁バリアーで互いに隔離されており、ここで当該長いストリップが液体保持受け器を構成する壁により包囲され、前記壁の一枚が前記取外し可能な流体不浸透性の電気絶縁バリアーである、当該システム。

【請求項 2】 プレキャスト二次元電気泳動ゲルシステムであって、長いストリップ状の第一電気泳動分離媒体及びスラブ状の第二電気泳動分離媒体を含んで成り、前記長いストリップ及び前記スラブは単独の支持手段上に保持されており、且つ取外し可能な流体不浸透性の電気

絶縁バリアーで互いに隔離されており、ここで当該長いストリップが、前記第一電気泳動分離媒体を外気との接触から完璧に隔離する囲いの中に入っており、前記囲いの一枚の壁が前記取外し可能な流体不浸透性の電気絶縁バリアーであり、そして前記囲いの別の壁が取外し可能な水分不浸透性シールである、当該システム。

【請求項 3】 プレキャスト二次元電気泳動ゲルシステムであって、長いストリップ状の第一電気泳動分離媒体及びスラブ状の第二電気泳動分離媒体を含んで成り、前記長いストリップ及び前記スラブは単独の支持手段上に保持されており、且つ取外し可能な流体不浸透性の電気絶縁バリアーで互いに隔離されており、ここで当該長いストリップが水性液体の吸収により膨張可能である乾燥ゲルである、当該システム。

【請求項 4】 前記単独の支持手段が一組の実質的な平

B8

行な支持プレートである、請求項1～3のいずれか1項記載のプレキャスト二次元電気泳動ゲルシステム。

【請求項5】 前記長いストリップ及び前記スラブがポリアクリルアミドゲルである、請求項1～3のいずれか1項記載のプレキャスト二次元電気泳動ゲルシステム。

【請求項6】 前記長いストリップがその縦方向に広がる一定のpH勾配を形成する所定の分布でその上に固定された帯電基を含む、請求項1～3のいずれか1項記載のプレキャスト二次元電気泳動ゲルシステム。

【請求項7】 サンプルを二次元電気泳動により成分へと分けるための方法であって、

(a) 前記サンプルを第一及び第二電気泳動分離媒体を含んで成る二次元電気泳動設備の第一電気泳動分離媒体の上に装填する、ここで当該第一電気泳動分離媒体は長いストリップ状であり、そして当該第二電気泳動分離媒体はスラブ状であり、前記長いストリップ及び前記スラブは単独の支持手段上に保持されており、且つ取外し可能な流体不浸透性の電気絶縁バリアーで互いと隔離されている；

(b) 前記長いストリップに電場をかけ、前記サンプル成分を当該長いストリップ伝いに間隔の置かれたゾーンへと分割する；

(c) 前記バリアーを取外し、そして前記長いストリップにおけるゾーン全てを前記スラブと電氣的及び流体的に接触させる；そして

(d) 前記長いストリップ及び前記スラブの双方に前記長いストリップに対して垂直方向において電場をかけ、前記スラブにおいて前記ゾーンの電気泳動分離を行う；ことを含んで成り、

ここで当該長いストリップが液体保持受け器を形成する壁により包囲され、その壁の一枚が前記取外し可能な流体不浸透性の電気絶縁バリアーであり、そして前記

(a) が前記サンプルを前記液体保持受け器の中で前記長いストリップと流体接触させるように配置することを含んで成る、当該方法。

【請求項8】 前記単独の支持手段が間にすき間を有する第一及び第二の実質的に平行な支持プレートとそのすき間の中の前記スラブを含んで成り、前記第一支持プレートは前記第二支持プレートの一辺を突き出した露出ストリップを有し、ここで前記長いストリップの前記露出ストリップに付着されているものであり、そして前記

(c) が前記長いストリップを前記すき間の中に移動させて前記スラブと接触させることを含んで成る、請求項7記載の方法。

【請求項9】 前記長いストリップがその縦方向に広がる一定のpH勾配を形成する所定の分布でその上に固定された帯電基を含み、そして前記(b)が前記サンプル成分を等電点電気泳動によりゾーンへと分割することを含んで成る、請求項7記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は二次元電気泳動分離の分野に属する。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】 二次元電気泳動は複雑なタンパク質混合物を分離するための有用な技術であり、往々にして一次元分離で得られるよりもはるかに高い分離能力を供するものである。

【0003】 その技術は成分混合物を2組の特性に従って順々に分けることを可能とし、多種多様な分離パラメーターの組合せにある。一の組合せは電荷に基づく分離、それに続く分子量に基づく分離である。その他は一の濃度のゲルにおける分離、それに続く同じ材料であるが異なる濃度のゲルにおける分離である。二次元分離は(1) pHの段階式変化を作り上げるため、(2) 最初に均質ゲル、次いで孔質勾配ゲルで分離するため、(3) 第一のタンパク質溶解剤と別の溶解剤とを含む媒体で分離するため、又はタンパク質溶解剤を一の濃度及び別の濃度で含む媒体において分離するため、(4) まだ不連続緩衝液系で、次いで連続緩衝液系で分離するため、並びに(5) まず等電点電気泳動で、次いで均質又は孔質勾配電気泳動で分離するため、にも利用されている。このような組合せは血清又は細胞タンパク質、細菌タンパク質、非ヒストンクロマチンタンパク質、リボソームタンパク質、リボヌクレオタンパク質とリボソームタンパク質との混合物、並びに核酸等の多種多様な成分を分離するために利用できる。

【0004】 二次元電気泳動システムの第一次元は典型的には1.0mm付近の直径を有する長い桿状ゲルで実施され、泳動及び分離は桿の縦方向に伝いで行われる。溶質が桿伝いで個々のゾーンへと分類されたら、この桿をスラブゲルの一辺伝いに配置し、そしてこの桿及びスラブに電流を、桿の軸と垂直の方向又は横断方向にわたってかける。このことは、桿の各ゾーンからスラブゲルへの溶質の泳動、及び各ゾーン内での溶質の分離を及ぼす。

【0005】 二次元電気泳動における問題は、第一次元分離を行った後の桿状ゲルの取扱い及び第二次元分離の準備のためにこのゲルをスラブゲルと接触させるように設置することにある。第一次元分離は一般に桿状ゲルをそれをキャストするチューブの中に入れたまま実施する。チューブ内での分離を実施したら、この桿を物理的にチューブから取外し、次いでスラブゲルの露出辺伝いに設置する。チューブからの桿の取り出し及びそれをスラブゲルの辺伝いに設置する作業は慎重な取扱いを要し、そしてたとえ十分な注意を払ったにしても、ゲルは往々にして損傷し、そして溶質ゾーンはゆがむ又は乱れるものである。桿とスラブゲルとの製剤及び完全接触はゲル間での電氣的連続性及び障害のない溶質流動の双方を達成するために重要である。更に、桿の取扱い及び

設置にかなりの時間がかかり、そして失敗はデーターの損失をもたらさう。ゲルストリップが桿の代替品として利用できるが、似たような問題、失敗の機会及び再現性の欠如を有する。

【0006】多くのこれらの問題は、二通りの分離を介在式挿入又はいずれかのゲルの取外しを行うことなく連続して行うことを可能にする、長い第一次元ゲル及びスラブ状第二次元ゲルの双方を共平面配置において含むゲルパッケージにより解決されている。一のかかる配置及びその利用方法は1989年10月17日に特許された米国特許第4,874,490号「Pre-Cast Gel Systems for Two-Dimensional Electrophoresis」Denis F. Hochstrasser 及び1994年9月28日公開のBio-Rad Laboratories Inc. の対応ヨーロッパ特許第0,366,897 B1号において開示されている。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明はプレキャスト二次元ゲルシステムに関し、二次元分離のそれぞれのためのゲルは共通の支持体の上で保持され、且つ使用される。第一次元ゲルは長いストリップであり、このストリップの縦方向において電流を受容するように配備され、一方第二次元ゲルはこのストリップと対面し、そして好ましくはそれと平行な辺を有する。このストリップ及びスラブは互いとバリヤーで隔離され、そのバリヤーは流体不浸透性（又は流体保持性）及び電氣的に絶縁性であり、しかも取外し可能である。好適な態様において、このバリヤーはかかるストリップを包囲する受け器の一枚の壁であり、この受け器は液体、特に緩衝溶液の中に希釈されたサンプル自体を保持することが可能である。

【0008】本発明の一定の態様において、このストリップは水又は水性溶液の吸収より膨張する乾燥ゲルであり、これにより水性緩衝液の中に希釈されたサンプルはストリップを完璧に濡らして膨張させることができる。使用前に乾燥状態に保たれることを要するストリップのためには、この受け器はストリップを環境水分から隔離するように封じ込める取外し可能な不透湿性シールを更に含む。支持体のための好都合な構造は一組の平らで平行なプレートであり、一方のプレートは一方向伝いで他方のプレートよりも長さが長くなっており、長めのプレートの内面の一部を露出させている。

【0009】このスラブゲルはプレート間のすき間の中に保持され、同時にストリップゲルは長めのプレートに露出領域上で好ましくはストリップゲルと短めのプレートの最も近い辺との間にすき間を残して付着されている。

【0010】使用の際、一次元分離は、ストリップを流体保持性且つ電氣的に絶縁性のバリヤーによりスラブから隔離して実施する。このバリヤーは壁のスラブ側上にエアースき間を有する一様な保持壁であってよく、この場合電気絶縁はこのエアースき間により、又はこのエア

ースき間及び保持壁の双方により達成されうる。本発明の一定の形態において、このエアースき間は好ましく、なぜならこれはバリヤーが長めのプレートの露出部分の上に配置されることを可能にし、そしてバリヤーの取外しを容易にするからである。第一次元分離を実施したら、このバリヤーを外し、そして2枚のゲルを第二次元分離のために接触させる。

【0011】これらの詳細及び本発明のその他の特徴は以下の説明により明らかとなる。

【0012】

【発明の実施の形態】本発明は一般に任意の二次元分離に適用でき、そして第一の分離を第一次元（長いストリップ）で実施し、そして別の分離を第二次元（スラブ）で実施する手順において最も有用である。第一次元は例えば天然ゲルであってよく、乾燥でも膨潤型でもよく、又は担体両性電解質もしくは界面活性剤を含むゲルであってもよい。その他の例として、このゲルはDNAの分離のための特製のもの、例えば一の制限酵素を第一次元において用い、そして別の酵素を第二次元に使用できるもの、又は制限酵素を第一次元に使用し、そして変性剤を第二次元に使用するものであってよい。その他の例は電気泳動における当業者に自明であらう。

【0013】更なる例において、第一次元がpH勾配をストリップの縦軸方向に含み、そして第二次元がpH勾配をストリップに対して垂直方向において有するか又は勾配を全く有さないものであってよい。ストリップのpH勾配は様々な態様で形成できる。それは例えばpH勾配を形成するように帯電した、又はかかる勾配を形成するように帯電可能な固定化基を有するマトリックスであってよい。他方、このpH勾配はストリップマトリックス内に固定されていない担体両性電解質により形成されていてよい。

【0014】固定化基を含むストリップは当業界において公知であり、そして市販されている。その例は引用することで本明細書に組込む米国特許第4,130,470号（Rosengren ら、1978年12月19日特許）に開示されている。このマトリックスは一様な支持材料、例えば顆粒、繊維もしくは膜材料、又はゲルであってよい。マトリックス材料の例はポリアクリルアミド、セルロース、アガロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、デンプン、シリコーンゲル、及びステレンジビニルベンゼンのポリマー、並びにこれらの特性の組合せである。正に帯電した又は帯電可能な基の例はアミノ基及びその他の窒素含有基である。負に帯電した又は帯電可能な基の例はカルボン酸基、スルホン酸基、硼酸（boronic acid）基、及びホスホン酸基又はリン酸基、並びにこれらの酸のエステルである。その他の例は当業者に自明であらう。マトリックス上への基の固定化は共有結合、又はその他の手段であって其の位置を固定し、そして電場の影響下での又はマトリックスを通る

流体又は溶質の移動によるその移動を防ぐものにより達成できる。帯電基をポリマーゲルマトリックスに組込む好適な手段は、帯電モノマー又は帯電架橋剤をゲルモノマーと共重合させることによる。

【0015】基の濃度は好ましくは等電点電気泳動に適する固定化pH勾配を形成するように単調式に高める又は下げる状況で変えてよい。特定の濃度は本発明に重要ではなく、そして分離の必要性に応じて変わるであろう。典型的には、帯電基の濃度はゲル中で約 10^{-2}M ~約 10^{-4}M の範囲であろう。長いストリップは更に好ましくは、使用前は乾燥状態であり、水の吸収により膨張可能なものである。一定のpH勾配を含む乾燥ストリップはPharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden より入手できる。

【0016】このスラブゲルは一般に水性ゲルであり、その例は広範囲のゲル濃度及び孔質度を有するポリアクリルアミドゲル、デンプンゲル及び寒天ゲルである。このゲルは均一な濃度又は濃度勾配を含んでよく、溶解剤を有しても有さなくてもよく、又は様々なタイプ及び濃度の溶解剤を有してよく、そして連続又は不連続の緩衝系を有してよい。様々なタイプのゲルが当業者に自明であろう。

【0017】添付図面は本発明の一の実施例の詳細な図を供する。

【0018】図1の透視図及び図2の縦方向断面図は本発明に係るプレキャストゲルカセット11を示し、このカセットの構造部材は長さ不均等の2枚の平らなプレート12、13より成る。短めのプレート13は3つの辺が長めのプレート12の3つの辺と整合しており、そして露出した長めのプレートの内面の領域14が残っている。本発明の範囲に属する別の構造においては、このカセットは長めのプレートの一部を露出することなく構築される。2枚のプレート間のすき間はプレートの側辺伝いに位置する一組のスペーサー15、16により設定され、そしてスラブゲル17はこのすき間の一部を占めている。プレート12、13及びスペーサー15、16は成形又は溶解により形成されるユニタリー構造であるか、又はスラブゲルサンドイッチ及びカセットの製造業者に周知の慣用の構造のクランプにより結合されたものである。長めのプレートの露出領域に隣接するすき間でのストリップ18は空のままとなっており、その理由はその理由については以下の説明より明らかとなる。

【0019】長めのプレートの露出領域14伝いにあるのは囲い21であり、液体の保持のための受け器をそれらがスラブゲル17と接触しないように保つように形成している。この囲い21の壁23（スラブゲル17に直面している壁）はその連結線分24が人的な加圧により簡単に破断できるように構築されている。その結果、壁23は第一次元分離が終了した後にすばやく且つきれいに除去できる。連結線分24は例えば筋付きとなつて

いるか、もしくは囲い21の残りの部分よりも弱い材料でできていてよく、又は簡単に破壊でき、しかも破壊前は液体を保持できる連結を形成する任意のその他の手段より成ってよい。囲い21の残りの壁は好ましくは疎水性材料より成る。囲い21の頂部はリザーバー22の内容物を貯蔵及び輸送中に損傷から保護するため並びにその内容物を使用時まで乾燥状態に保つため、不透湿性材料25の取外し可能なストリップによりシールされていてよい。シール25は好ましくは指圧で剥がすことにより除去できるものである。

【0020】プラスチック裏地ストリップ27を有する乾燥一定pH勾配ゲル26のストリップがリザーバー22の内側に配置されている。本明細書に説明の通り、ストリップとして考えられているものには一般にプレキャストゲル、乾燥自然ゲル、又は乾燥一定pH勾配ゲルが含まれる。図2に示す配置において、プラスチック裏張りゲルはゲル側面26を支持プレート12に接触させて配置している。このゲルは同様に逆方向に配置してもよいが、この図に示している配置が好ましく、なぜならゲル26がプレート12に付着されるからである。乾燥ゲル及びプラスチック裏地はリザーバー22全体を占めておらず、リザーバーはその代わりにゲルの上方及びその他方の両方に液体アクセスのためのクリアランスを残している。

【0021】図3及び4は使用のために用意されたカセットを示す。シール25を剥がす又は何らかして除去し、そして油31をリザーバーに添加してゲル及びその裏地にかぶせる。サンプル及び緩衝液の混合物32を次に添加する。油31はサンプル及び緩衝液の混合物32と非混和性であり、且つそれより低い密度であり、そして更にゲル26に吸収されないものを選定する。かくしてサンプル及び緩衝液の混合物32は油31の下をくぐり通ってゲルにより吸収され、ゲルを膨張させ、同時にゲル26及びサンプルと緩衝液との混合物32は油31により外気から保護される。この状況でリザーバーの中に入れるサンプル及び緩衝液の混合物の量はこの混合物がゲル26により完全に吸収され、そしてゲルの実質的に均一な膨張を及ぼすように選定されるである。ゲルが均一に膨張することは限定ではなく、そしてあまり均一に膨張しないゲルが容易に利用される。サンプル及び緩衝液混合物の典型的な容量は $200\mu\text{l}$ である。

【0022】ゲルがサンプル緩衝液で膨張し、そして適当な時間（一般に1又は2時間）緩衝液で平衡にした後、膨張ゲルにわたりその縦方向伝いで電流を流し、第一次元分離を実施する。電源とゲルとの電氣的接触は囲い21の壁伝いの導線33、34（図4）及び支持プレート12の接触面伝いの短い距離により供される。電場の方向は矢印35で表示する。典型的な電圧は3000ボルトで4時間とする。サンプル成分の分離は等電点電気泳動により及ぼされ、成分を個々のゾーンへと分類さ

せ、ここでこのゲルの縦方向にわたるその位置は成分の電荷（又は等電点）に対応する。等電点電気泳動の代わりに様々な電気泳動、例えばゾーン電気泳動及びその他の方法が利用でき、その分離はサンプル中に存在する様々な物質の分子量、電荷、等電点又はその他の区別される特徴に基づいて行われる。ここまでに説明してきた手順は好ましくは水平位置にある支持プレート12、13で実施しているが、この手順は垂直位置にあるプレートで実施することもできる。

【0023】第一次元分離が終了したら、油31をリザーバーから除去し、ゲルの縦方向伝いに間隔を置いたゾーンで配置されたサンプル成分を含む膨張ゲルが残る。第二次元分離のための緩衝液をリザーバーの中に入れ、そしてゲルをこの緩衝液で適当な時間平衡にする。平衡化は例えば緩衝液を改めて2回、10分づつ適用することより成ってよい。この緩衝液は第一次元分離のために用いたものと異なる緩衝液であってよい。

【0024】平衡化が完了したら、平衡緩衝液を取り除き、そして破壊可能な壁23を取外す。次いでカセットを好ましくは回転させて支持体12、13が図5に示すように垂直となり、pH勾配ゲルをその縦軸が水平となるように配置する。ゲル形成液体材料36、例えば新たな緩衝液と混合した高温アガロスをスラブゲル17の上方の支持プレート間のすき間空間18の中に入れ、そして分離したゾーン（例えば、等電点電気泳動による勾配ゲルの如き）を含むストリップゲル26（ある態様においては、pH勾配ゲル）を液体材料36の中にすべり込

ませる又は降ろし（矢印37で表示）、2枚のゲルが流体接触及び電気接触するようにする。好ましくは、ストリップゲル26を液体の中に完全に浸す。次いでこの液体を固化させるわけであるが、その後の工程は材料36が液体のままでも実施することもできる。

【0025】いずれにせよ、カセットを垂直スラブゲルのために考案された慣用の電気泳動セルの中に入れる。適当な電気泳動セルの一例はBio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, USA の製品Mini-PROTEAN（登録商標）II Cell である。同様に適当なその他の電気泳動セルがその他の商業的供給者から入手できる。次いで電気泳動を、矢印38で示す方向で電場をかけることにより実施し、第一次元分離ゾーンそれぞれ（即ち、一定の態様において、各等電点電気泳動ゾーン）の中の成分をゲル内の垂直線分伝いで分離させる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明に係るプレキャスト二次元ゲルカセットの透視図。

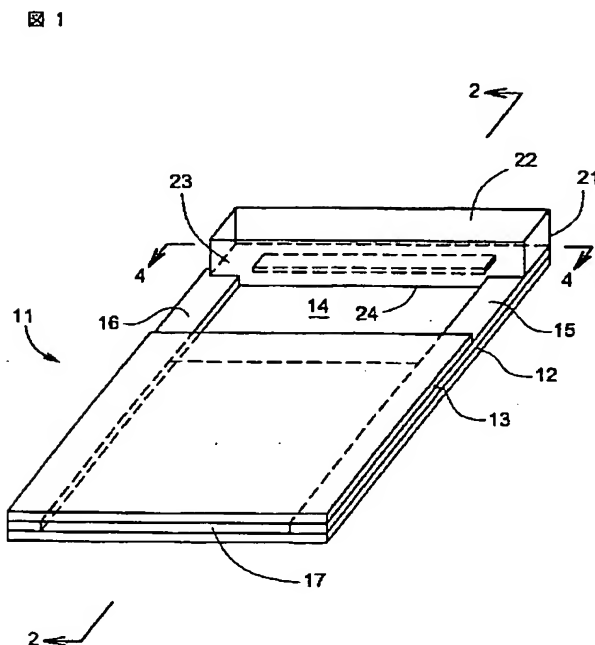
【図2】図1の線分2-2伝いの図1のゲルカセットの縦方向断面図。

【図3】第一次元分離のために用意したゲルカセットを示す、図2と類似の縦方向断面図。

【図4】第一次元分離中のゲルを示す、図1の線分4-4伝いで、図1のゲルカセットの横断面図。

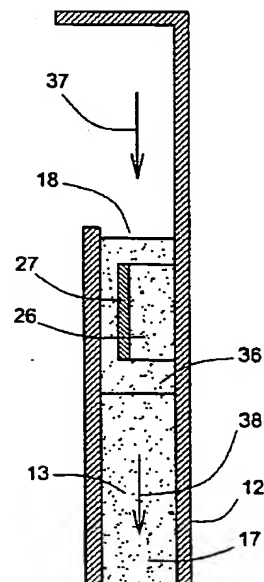
【図5】第二次元分離のために用意したゲルカセットを示す、図1及び2と類似の縦方向断面図。

【図1】



【図5】

図5



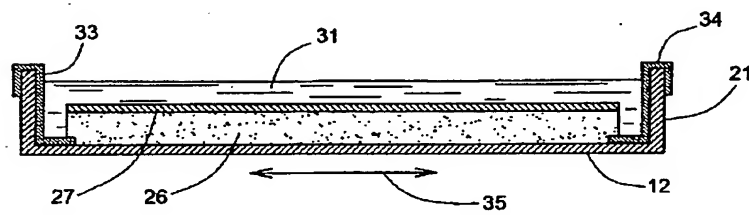
2



8



4



(58) 調査した分野(Int. Cl. 7, DB名)
G01N 27/447
WPI (DIALOG)

(58) 調査した分野(Int. Cl. 7, DB名)
G01N 27/447
WPI (DIALOG)